

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 11062:2016

Xuất bản lần 1

**THỰC PHẨM CHỨC NĂNG –
XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG COENZYM Q10
BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO**

*Dietary supplements – Determination of coenzyme Q10 content
by high performance liquid chromatographic method*

HÀ NỘI – 2016

Lời nói đầu

TCVN 11062:2016 được xây dựng trên cơ sở AOAC 2008.07
Coenzyme Q10 content in raw materials and dietary supplements.
High-performance liquid chromatography-UV;

TCVN 11062:2016 do Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm
quốc gia biên soạn, Bộ Y tế đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường
Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Thực phẩm chức năng – Xác định hàm lượng coenzym Q10 bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

Dietary supplements – Determination of coenzyme Q10 content by high performance liquid chromatographic method

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector UV để xác định hàm lượng coenzym Q10 (CoQ10) trong nguyên liệu và các thành phẩm thực phẩm chức năng.

2 Nguyên tắc

Chiết CoQ10 ra khỏi nền mẫu thử bằng hỗn hợp axetonitril : tetrahydrofuran : nước (tỉ lệ thể tích 55 : 40 : 5), pha loãng dịch chiết được bằng dung dịch sắt (III) clorua 0,1 % trong alcohol để chuyển CoQ10 dạng khử về dạng oxy hóa. Phân tích dung dịch thu được trên hệ thống HPLC pha đảo với detector UV, sử dụng cột sắc ký C18. Định lượng CoQ10 bằng phương pháp ngoại chuẩn với đường chuẩn năm điểm.

3 Thuốc thử

Tất cả thuốc thử được sử dụng phải là loại tinh khiết phân tích, dùng cho sắc ký lỏng hiệu năng cao hoặc có chất lượng tương đương. Nước sử dụng phải là nước cất hai lần hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có quy định khác.

CẢNH BÁO: Axetonitril, THF, alcohol và hexan là những hóa chất dễ cháy, cần phải để xa nguồn nhiệt và ngọn lửa.

3.1 Axetonitril.

3.2 Tetrahydrofuran (THF).

3.3 Thuốc thử alcohol, hỗn hợp etanol : 2-propanol : metanol (tỉ lệ thể tích 90 : 5 : 5).

3.4 n-Hexan.

3.5 Pha động

Trộn 550 ml axetonitril (3.1), 400 ml THF (3.2) và 50 ml nước. Trộn đều và loại khí.

3.6 Dung dịch sắt (III) clorua 0,1 % trong alcohol

Cân 100,0 mg $\pm$ 10 mg sắt (III) clorua (FeCl_3) (độ tinh khiết $\geq 98\%$), chính xác đến 0,01 mg, cho vào bình định mức 100 ml. Thêm khoảng 50 ml thuốc thử alcohol (3.3), đặt bình định mức vào bể rung siêu âm, rung siêu âm trong 30 min, thêm thuốc thử alcohol (3.3) đến vạch và trộn đều.

3.7 Chất chuẩn coenzym Q10 (độ tinh khiết $\geq 98\%$) ¹⁾ hoặc chất chuẩn thứ cấp có chất lượng phù hợp.

3.8 Dung dịch chuẩn

3.8.1 Dung dịch chuẩn gốc

Cân chính xác khoảng 125 mg $\pm$ 5 mg chất chuẩn (3.7) , chính xác đến 0,01 mg, cho vào bình định mức 100 ml (4.8). Thêm vào khoảng 50 ml dung dịch pha động (3.5), rung siêu âm trong 30 min, thêm pha động đến vạch, lắc đều. Dung dịch chuẩn gốc này có nồng độ CoQ10 khoảng 1,25 mg/ml.

3.8.2 Dung dịch chuẩn làm việc

Dùng pipet (4.6) lấy các thể tích chính xác dung dịch chuẩn gốc (3.8.1) cho vào bình định mức như Bảng 1, thêm pha động đến vạch.

Bảng 1 – Chuẩn bị các dung dịch chuẩn làm việc

Số	Thể tích dung dịch chuẩn gốc, ml	Thể tích định mức, ml	Nồng độ xấp xỉ, mg/ml
1	5	50	0,125
2	4	50	0,100
3	3	50	0,075
4	2	50	0,050
5	2	100	0,025

¹⁾ Có thể sử dụng chất chuẩn ubiquinone của U.S. Pharmacopeia, Rockville, MD, USA. Thông tin này đưa ra để thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

4 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường và cụ thể như sau:

4.1 Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao, gồm bơm, bộ bơm mẫu tự động, detector UV.

4.2 Cột phân tích HPLC, Hypersil ODS, kích thước cột 4,0 mm × 125 mm, cỡ hạt 5 $\mu\text{m}^{2)}$ hoặc Phenomenex Prodigy ODS-3, kích thước cột 4,6 mm × 150 mm, cỡ hạt 5 $\mu\text{m}^{3)}$ hoặc loại tương đương.

CHÚ THÍCH: Chiều dài và đường kính của cột có thể được thay đổi theo kỹ thuật sử dụng HPLC.

4.3 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,01 mg.

4.4 Màng lọc PTFE, cỡ lỗ 0,45 μm .

4.5 Bể rung siêu âm.

4.6 Pipet, có thể phân phối chính xác các thể tích 2, 5, 8 và 10 ml.

4.7 Xyranh, dung tích 3 ml hoặc 10 ml.

4.8 Bình định mức, bằng thủy tinh có độ quang hóa thấp, dung tích 50, 100 và 200 ml.

4.9 Ống đong chia vạch, dung tích 100, 500 và 1 000 ml.

4.10 Lọ đựng mẫu, có nắp teflon, dung tích 2 ml.

4.11 Cối, chày dùng trong phòng thí nghiệm.

4.12 Máy nghiền.

5 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không được quy định trong tiêu chuẩn này.

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng là mẫu đại diện và không thay đổi trong suốt quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

²⁾ Sản phẩm của Thermo Electron Corp., Waltham, MA, USA. Thông tin này đưa ra để thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

³⁾ Sản phẩm của Phenomenex Torrance, CA, USA. Thông tin này đưa ra để thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

6 Cách tiến hành

6.1 Chuẩn bị dung dịch thử

6.1.1 Mẫu nguyên liệu

Cân $125 \text{ mg} \pm 5 \text{ mg}$ mẫu thử, chính xác đến $0,01 \text{ mg}$, cho vào bình định mức 100 ml (4.8). Thêm khoảng 50 ml dung dịch pha động (3.5), rung siêu âm bình định mức trong 30 min , thêm pha động đến vạch và trộn kỹ.

Lấy chính xác $8,0 \text{ ml}$ dịch này vào bình định mức 100 ml khác, thêm $10,0 \text{ ml}$ dung dịch sắt (III) clorua $0,1 \%$ trong alcohol (3.6), thêm pha động (3.5) đến vạch và trộn kỹ. Lọc qua màng lọc PTFE $0,45 \mu\text{m}$ (4.4) vào lọ đựng mẫu (4.10).

6.1.2 Mẫu dạng viên nang cứng hoặc dạng viên nén

Lấy 20 viên, cân chính xác đến $0,01 \text{ mg}$ và tính khối lượng trung bình mỗi viên. Nghiền kỹ mẫu bằng chày, cối (4.11) hoặc máy nghiền (4.12) phù hợp.

Cân một lượng mẫu thử bằng năm lần ($\pm 10 \%$) khối lượng trung bình mỗi viên, chính xác đến $0,01 \text{ mg}$, cho vào bình định mức 100 ml (4.8). Thêm khoảng 50 ml dung dịch pha động (3.5), rung siêu âm bình định mức trong $30 \text{ min} \pm 5 \text{ min}$, thêm pha động đến vạch, đập nát, xoay và đảo chiều để trộn đều.

CHÚ THÍCH: Nếu lượng CoQ10 trong mỗi viên lớn hơn 100 mg thì cân một lượng bằng $2,5$ lần ($\pm 10 \%$) khối lượng trung bình mỗi viên. Nồng độ của dung dịch này không được lớn hơn $5,0 \text{ mg/ml}$.

Lấy chính xác một thể tích dịch này (sao cho nồng độ CoQ10 cuối cùng là $0,1 \text{ mg/ml}$) cho vào bình định mức 100 ml khác (ví dụ: dung dịch $5,0 \text{ mg/ml}$ thì lấy $2,0 \text{ ml}$). Thêm $10,0 \text{ ml}$ dung dịch sắt (III) clorua $0,1 \%$ trong alcohol (3.6), thêm pha động (3.5) đến vạch, đập nát, xoay và đảo chiều để trộn đều. Lọc qua màng lọc PTFE $0,45 \mu\text{m}$ (4.4) vào lọ đựng mẫu (4.10).

6.1.3 Mẫu dạng viên nang mềm

Lấy 20 viên và cân chính xác đến $0,01 \text{ mg}$. Thu lấy toàn bộ phần mẫu bên trong vỏ nang, rửa vỏ nang bằng n-hexan (3.4) và để khô. Cân các vỏ nang, chính xác đến $0,01 \text{ mg}$, từ đó tính khối lượng của mẫu chứa trong mỗi viên nang.

Cân một lượng mẫu thử bằng mười lần ($\pm 10 \%$) khối lượng trung bình của mẫu chứa trong mỗi viên nang, chính xác đến $0,01 \text{ mg}$, cho vào bình định mức 200 ml (4.8). Thêm khoảng 100 ml dung dịch pha động (3.5), rung siêu âm bình định mức trong thời gian $30 \text{ min} \pm 5 \text{ min}$, thêm pha động đến vạch, đập nát, xoay và đảo chiều để trộn đều.

CHÚ THÍCH: Nếu lượng CoQ10 trong mỗi viên lớn hơn 100 mg thì cân một lượng bằng năm lần ($\pm 10 \%$) khối lượng trung bình mỗi viên. Nồng độ của dung dịch này không được lớn hơn $5,0 \text{ mg/ml}$.

Lấy chính xác một thể tích dịch này (sao cho nồng độ CoQ10 cuối cùng là 0,1 mg/ml) cho vào bình định mức 100 ml khác (ví dụ: dung dịch 5,0 mg/ml thì lấy 2,0 ml), thêm 10,0 ml dung dịch sắt (III) clorua 0,1 % trong alcohol (3.6), thêm pha động (3.5) đến vạch, đập nút, xoay và đảo chiều để trộn đều. Lọc qua màng lọc PTFE 0,45 μ m (4.4) vào lọ đựng mẫu (4.10).

6.2 Xác định bằng HPLC

6.2.1 Điều kiện vận hành HPLC

- Detector: UV-Vis ở bước sóng 275 nm;
- Thể tích mẫu bơm: 20 μ l;
- Tốc độ dòng pha động: 1,0 ml/min với chế độ đẳng dòng;
- Nhiệt độ buồng cột: nhiệt độ phòng.

CHÚ THÍCH: Các thông số về tỷ lệ pha động, thể tích mẫu bơm, tốc độ dòng, nhiệt độ buồng cột có thể được điều chỉnh tùy thuộc vào điều kiện thực tế của thiết bị HPLC được sử dụng.

6.2.2 Thử độ ổn định của hệ thống

Cân bằng hệ thống bằng pha động trong ít nhất 10 min cho đến khi đường nền ổn định. Bơm lặp lại năm lần 20 μ l dung dịch chuẩn làm việc 1 (3.8.2). Hệ thống ổn định khi thời gian lưu của các pic chuẩn không lệch quá 0,5 min, độ lệch chuẩn lặp lại tương đối (RSD) của diện tích pic $\leq$ 2,0 %.

6.2.3 Dựng đường chuẩn

Sau khi thiết bị đã ổn định, tiến hành bơm lần lượt các dung dịch chuẩn làm việc đã chuẩn bị sẵn ở (3.8.2) vào hệ thống HPLC.

Xác định diện tích hoặc chiều cao pic của các chuẩn trên sắc đồ, dựng đường chuẩn dựa vào diện tích hoặc chiều cao pic của mỗi CoQ10 với nồng độ chuẩn làm việc tương ứng. Hệ số tương quan tuyến tính (r^2) phải $\geq$ 0,995.

6.2.4 Phân tích mẫu thử

Bơm mẫu thử với cùng điều kiện như bơm chuẩn, xác định diện tích hoặc chiều cao pic. Dựa vào đường chuẩn, xác định hàm lượng CoQ10 có trong mẫu thử.

Nếu diện tích pic hoặc chiều cao pic của mẫu lớn hơn diện tích pic hoặc chiều cao pic của chuẩn cao nhất thì phải tiến hành pha loãng mẫu và bơm lại.

TCVN 11062:2016

7 Tính kết quả

Tính hàm lượng CoQ10 có trong mẫu, X , được biểu thị bằng miligam trên gam (mg/g), theo công thức sau:

$$X = \frac{C \times V_1 \times V_3}{V_2 \times w}$$

trong đó:

- C là nồng độ của dung dịch thử đã pha loãng, xác định được từ đường chuẩn, tính bằng miligam trên mililit (mg/ml);
- V_1 là dung tích bình định mức chứa phần mẫu thử, tính bằng mililit (ở đây $V_1 = 100$ ml);
- V_2 là thể tích dịch chiết mẫu lấy đem đi phản ứng với sắt (III) clorua, tính bằng mililit (ml);
- V_3 là dung tích bình định mức chứa dịch chiết mẫu đã pha loãng, tính bằng mililit (ở đây $V_3 = 100$ ml);
- w là khối lượng mẫu, tính bằng gam (g).

8 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử đã dùng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- tất cả các chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy ý lựa chọn cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- kết quả thử nghiệm thu được;
- nếu kiểm tra độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

Phụ lục A
(Tham khảo)

Kết quả phép thử liên phòng thử nghiệm

Mẫu ^a	Giá trị trung bình, mg/g	s_r	RSD_r , %	s_R	RSD_R , %	Chỉ số HorRat	Số phòng thử nghiệm tham gia	Số phòng thử nghiệm ngoại lệ
A	989	11,9	1,2	37,4	3,78	1,89	10	0
B	36,1	0,606	1,68	6,15	17,1	5,17	8	0
C	882	27,6	3,13	28,1	3,19	1,56	10	0
D	258	2,42	0,94	7,95	3,08	1,26	10	0
E	50,7	1,18	2,34	5,18	10,2	3,26	10	0
F	182	2,18	1,2	6,77	3,72	1,44	10	0
G	44,5	0,395	0,89	3,39	7,62	2,39	9	1
H	0	—	—	—	—	—	10	—
CHÚ THÍCH: s_r độ lệch chuẩn lặp lại; RSD_r độ lệch chuẩn tương đối lặp lại; s_R độ lệch chuẩn tái lập; RSD_R độ lệch chuẩn tương đối tái lập; A nguyên liệu; B mẫu trắng thêm chuẩn nồng độ thấp; C mẫu trắng thêm chuẩn nồng độ cao; D viên nang cứng chứa 100 mg CoQ10; E viên nang mềm chứa 30 mg CoQ10; F viên nang mềm chứa 50 mg CoQ10, 30 IU d-alpha tocopheryl axetat, 70 µg selen; G viên nhai với 100 mg CoQ10; H mẫu trắng.								